肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠的制备及鉴定*

苏春晓 张晓玉 曾晗 陈压西 阮雄中 杨萍**

（重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室，脂质研究中心，重庆 400016）

摘要 目的 运用 Cre/Loxp 重组酶系统构建肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠并进行鉴定和验证，为研究 CD36 的生物学功能奠定基础。 方法 构建 CD36 打靶载体，电转转染胚胎干细胞，通过长链 PCR 筛选出正确同源重组的阳性克隆，阳性胚胎干细胞克隆经扩增后，注射入 C57BL/6J 小鼠的囊胚中，获得嵌合小鼠，再与 Flp 小鼠交配筛选获得 Flox 杂合子小鼠，该小鼠与引进的 Alb-Cre 小鼠交配，在 F3 代获得 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$基因型小鼠，即为肝脏特异性 CD36 敲除小鼠。采用 PCR 鉴定小鼠基因型，PCR、实时荧光定量 PCR 和 Western blot 验证小鼠肝脏 CD36 敲除效果，Western blot 检测小鼠肾脏、脂肪和心肌组织 CD36 表达情况，HE 染色观察小鼠肝脏形态学改变。 结果 建立了 CD36 基因的 Flox 杂合子小鼠，与 Alb-Cre 小鼠交配后，在 F3 代筛选出 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$和 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$基因型小鼠，DNA 水平证实 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$基因型小鼠肝脏 CD36 基因通过 Cre/Loxp 重组酶系统被敲除。与 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$基因型小鼠相比，$CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$基因型小鼠肝脏 CD36mRNA 和蛋白表达水平显著降低，肾脏、脂肪和心肌组织 CD36 蛋白表达无差别，肝脏形态学特征无明显差异。结论 通过 Cre/Loxp 重组酶系统成功构建了肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠，为研究 CD36 在肝脏代谢和肝脏疾病中的功能提供了动物模型。

关键词 CD36 基因 基因敲除 Cre/Loxp

中图分类号 Q819

Establishment and identification of liver-specific CD36 knockout mice

SU Chun-xiao ZHANG Xiao-yu ZENG Han CHEN Ya-xi
RUAN Xiong-zhong YANG Ping

(Centre for Lipid Research，Chongqing Key Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism，Chongqing Medical University，Chongqing 400016，China)

Abstract Objective：To generate mice with a liver-specific knockout of CD36 gene using the Cre-Loxp system, which will lay a foundation for the study of the biological function of CD36. Methods：CD36 targeting vector was constructed and electroporated into embryonic stem cells. Positive clones with correct homologous recombination were screened by long-chain PCR. Positive embryonic stem cell clones were amplified and injected into the blastocysts of C57BL/6J mice to obtain chimeric mice. And then mated with Flp mice to obtain Flox heterozygous mice. The Flox mice were mated with the introduced Alb-Cre mice, and $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$ mice were obtained in the F3 generation, which are liver-specific CD36 knockout mice. The genotypes of the

*基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81400786），重庆市教委科学技术研究项目（KJ1702029）

**通信作者，电子邮箱：420577305@qq.com

mice were identified by PCR. PCR, real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to verify the knockout effects of CD36 gene in the liver. The expression of CD36 in kidney, adipose tissue and myocardial tissue was detected by Western blot. Morphological changes of the liver were observed by HE staining. Results：Flox heterozygous mice with CD36 gene were established. After mating with Alb-Cre mice, $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^- and $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^+ genotypes were screened in F3 generation. DNA levels confirmed that $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^+ genotype mouse liver CD36 gene was knocked out by the Cre/Loxp recombinase system. Compared with mice with $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^- mice, $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^+ mice had significantly reduced expression of CD36 mRNA and protein in the liver, and there was no difference in the expression of CD36 protein in kidney, adipose tissue and myocardial tissue. There was no significant difference in the morphological characteristics of liver. Conclusion：Liver-specific CD36 knockout mice were successfully generated by the Cre/Loxp recombinase system, providing an animal model for the study of CD36's function in hepatic metabolism and diseases.

Key words CD36 gene gene knockout Cre/Loxp

CD36，又名脂肪酸转运蛋白(fatty acid translocase,cluster of differentiation 36, FAT/CD36), 属于 B 类清道夫受体家族。人 CD36 位于 7q11.2，有 15 个外显子，长 32kb，分子量约 88KD[1]。它是一种跨膜糖蛋白，包含两个跨膜结构域、两个非常短的胞质内结构域和一个有大量糖基化的细胞外结构域。在胞外结构域靠近羧基端包含三个二硫键，这些二硫键和大量糖基化证明对 CD36 在膜上的固定很重要[2]；靠近氨基端含有脂肪酸、氧化低密度脂蛋白或磷脂，血小板反应蛋白和恶性疟原虫感染的红细胞的结合结构域[3]。CD36 分布广泛，在脂肪细胞、巨噬细胞、心肌细胞、肝细胞等多种细胞上均有表达，通过与不同配体的相互作用，CD36 可调节多种生理和病理过程，包括清道夫受体功能，脂肪酸转运、脂质代谢和血管生成调节等[4]。

肝脏是人体重要的代谢器官，脂质代谢紊乱与肝脏疾病的发生发展有密切关系，而 CD36 在体内脂质稳态调节中起重要作用。研究表明，病理条件下如饮食诱导的肥胖和糖尿病，CD36 表达升高促进肝脏循环中脂肪酸的摄取[5]，也有文献报导 CD36 参与非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)中的脂质代谢紊乱[6]。近年来研究发现 CD36 在肝癌中也发挥作用，原发性肝癌上皮-间质转化的进展与 CD36 的表达和游离脂肪酸的水平密切相关[7]。目前关于 CD36 的研究多数基于体外实验，体内实验涉及有 CD36 基因敲除小鼠，但是缺乏一定的组织特异性，为了进一步研究肝脏 CD36 的功能，本课题组引进了 Alb-Cre 工具鼠并构建了 Flox 杂合子小鼠，根据 Cre/Loxp 重组酶系统的基因敲除技术，成功构建了肝脏特异性 CD36 敲除小鼠并对敲除效果进行了验证。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 引物由擎科生物技术(北京)有限公司合成，2*Taq Master Mix(with ddH_2O)购自诺唯赞生物科技(南京)有限公司，PrimeSTAR@ GXL DNA Polymerase、SYBR Green、逆转录试剂盒和 DL500、DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程（大连）有限公司，琼脂糖和 BCA 蛋白定量试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司，50xTAE 购自生工生物工程(上海)股份有限公司 ，

CD36 antibody 购自美国 Novus Biologicals 公司，ECL substrate 化学发光试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。实验中构建 Flox 杂合子小鼠所用细胞和动物及 Alb-Cre 小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司，C57BL/6 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心，实验中动物均按 SPF 级动物饲养标准饲养。

1.2 方法

1.2.1 CD36$^{fl/+}$基因型小鼠的制备　以 CD36 的 5 号外显子为靶基因，构建条件性 CD36 基因敲除(CD36-cKO)打靶载体，该载体包含 2.7 kb 5'同源臂、2.6kb Flox 区域和 PGK-Neo-polyA、3.4kb 3'同源臂和 MC1-TK-polyA 负筛选标记，如图 1 所示。该载体经线性化后，电转转染胚胎干细胞(Embryonic Stem Cells,ES)，经长片段 PCR 鉴定，获得正确同源重组的阳性克隆。ES 细胞 5'同源臂鉴定引物：上游引物 5'-CAAAACAGCCATACCATCCATACCAT-3'；下游引物 5'-GGCCTACCCGCTTCCATTGCTC-3'。3'同源臂鉴定引物：上游引物 5'-CCGTGCCTTCCTTGACCCTGG-3'；下游引物 5'-CAACCTAACAAATCTGAAACAACCCAAG-3'。反应条件：94℃2min，1 个循环；98℃20s，66℃20s，68℃2min30s，32 个循环；68℃5min，1 个循环。阳性 ES 细胞克隆经扩增后，注射入 C57BL/6J 小鼠的囊胚中，获得嵌合小鼠。具体步骤及条件见参考文献[8-11]。高比例嵌合小鼠与 Flp 小鼠交配筛选获得 Flox 杂合子小鼠，提取尾巴 DNA 验证基因型，实验条件如 1.2.3。

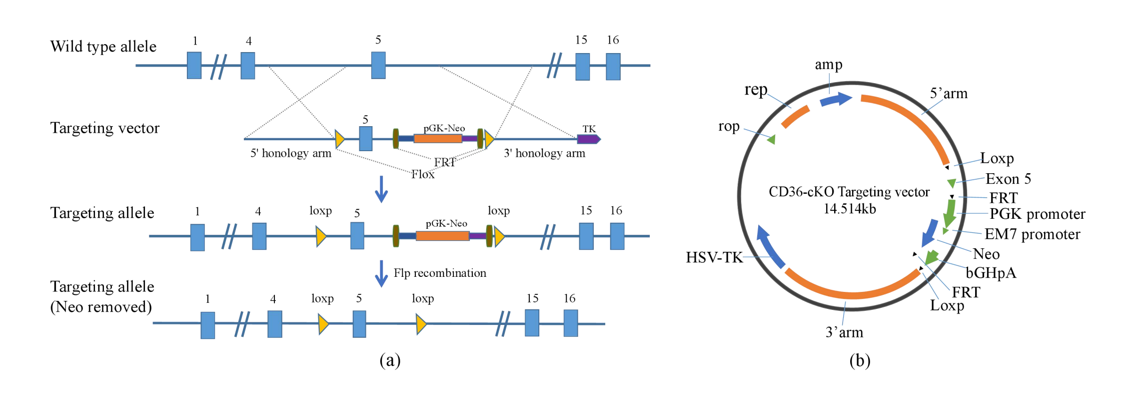


图 1 CD36 基因打靶位点和 CD36 条件性基因打靶载体示意图

Fig. 1 Schematic diagram of CD36 gene targeting site and CD36 conditional gene targeting vector

(a) The modes of CD36 targeting strategy

(b) Diagram of the strategy to generate CD36 targeting vector

1.2.2 肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠构建策略与流程　制备的 Flox 小鼠是以 CD36 的 5 号外显子为靶基因，在其两侧各插入一个 Loxp 位点，当与肝脏特异表达 Cre 重组酶(Alb-Cre)的小鼠交配后，Cre 重组酶特异性识别 Loxp 位点，通过同源重组实现肝脏特异性 CD36 敲除。构建流程如下：首先将构建的 Flox 杂合子小鼠 CD36$^{fl/+}$和引进的 Alb-Cre^{+}基因型小鼠分别与 C57BL/6 小鼠 1:1 交配扩大培养获得较多的 CD36$^{fl/+}$和 Alb-Cre^{+}基因型小鼠；然后 CD36$^{fl/+}$基因型小鼠自交筛选出 CD36$^{fl/fl}$ 基因型小鼠，CD36$^{fl/+}$基因型小鼠与 Alb-Cre^{+}基因型小鼠交配筛选出 CD36$^{fl/+}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠；最后 CD36$^{fl/fl}$ 基因型小鼠与 CD36$^{fl/+}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠交配筛选出 CD36$^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠，即为肝脏特异性 CD36 敲除小鼠，对照小鼠为 CD36$^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}基因型小鼠，如图 2 所示。

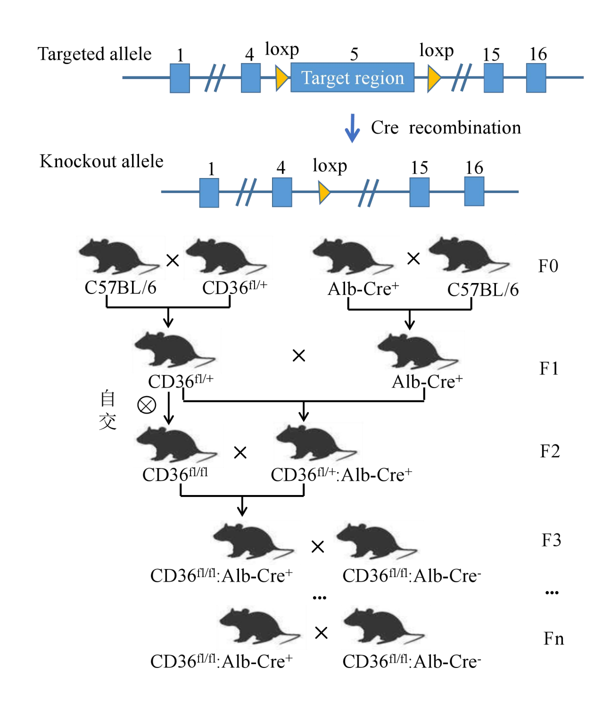


图 2　肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠模型构建策略和流程

Fig. 2 Strategy and procedure for construction of liver-specific CD36 knockout mouse model

1.2.3 肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠的基因型鉴定　出生后 3 周龄小鼠分笼、剪脚趾标记并剪取约 5mm 小鼠尾巴至灭菌 EP 管中，加 50ul 组织裂解液(25mM/L NaoH 和 0.2mM/L EDTA)，剪碎尾巴使之充分降解。电磁炉 99℃、800W 煮 1 小时，冷却后加入 50ul 组织裂解终止液(40mM/L Tris-Hcl)，混匀，常温 12000g 离心 3 分钟，提取上清用于 PCR 鉴定。用于 PCR 的 Loxp 和 Cre 引物序列见表 1，反应体系为 24ul：2×Taq Master Mix 12ul，上、下游引物(10uM/L)0.4ul，ddH2O 9.2ul，模板 DNA 2ul。Loxp 反应条件：94℃5min，1 个循环；94℃30s，62℃30s，72℃ 1min，35 个循环；72℃5min，1 个循环。Cre 反应条件：94℃2min，1 个循环；94℃30s，60℃30s，72℃30s，33 个循环；72℃5min，1 个循环。PCR 完成后，取 7ulPCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，最后使用凝胶成像系统分析小鼠基因型。

表 1　基因型鉴定引物信息

Tab. 1 Genotyping Primer Information

基因	引物序列	结果判定
flox/flox 小鼠引物	5'- TCCCTTGAATTGGCCAACTTTG -3' 5'- ACTGCCTGTGAGAACTTCTCAA -3'	429bp：CD36$^{fl/fl}$ 429bp+ 379bp ：CD36$^{fl/+}$ 379bp ：CD36$^{+/+}$
Alb-Cre 小鼠引物	5'- TGGCAAACATACCGAAGGG -3' 5'- CGGCAAACGGACACAAGGA -3'	450bp ：Alb-Cre^{+} 0bp：Alb-Cre^{-}

1.2.4 DNA 水平 Cre 重组酶活性验证　CD36$^{+/+}$:Alb-Cre^{-}、CD36$^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}和CD36$^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}三种基因型小鼠各 3 只解剖，肝脏灌注后，剪取约 30mg 组织按小鼠基因组抽提试剂盒说明书提取 DNA，PCR 进行扩增，上游引物 5'-TCCTCTTCCTCTTGAACACTCT-3'，下游引物 5'-TACTTGCTGTACTGGTTGATGG-3'，20ul 反应体系：ddH2O 11.2ul，5×PrimeStar GXL PCR Buffer 4ul，2.5 mM dNTP 2ul，CD36-P1 (10pmol/μl) 0.5ul，CD36-P2 (10pmol/μl) 0.5ul，PrimeStar GXL DNA Polymerase* 0.8ul，genomic DNA 1ul。反应条件：94℃2min，1 个循环；98℃20s，63℃20s，68℃1.5min，32 个循环；68℃5min，1 个循环。PCR 完成后，取 7ulPCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像系统分析小鼠肝脏表达的 Cre 重组酶是否发挥作用。

1.2.5 PCR 检测肝脏特异性 CD36 敲除小鼠肝脏 CD36mRNA 表达水平　CD36$^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}和 CD36$^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}两种基因型小鼠的肝脏组织采用 Trizol 法提取 RNA，逆转录成 cDNA 后进行 PCR，内参 18S 上游引物 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'，下游引物 5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3'；CD36 上游引物 5'-GAGCCATCTTTGAGCCTTCA-3'，下游引物 5'-TCAGATCCGAACACAGCGTA-3'，25ul 反应体系：ddH2O 10ul，上、下游引物 0.25ul，SYBR12.5ul，cDNA2ul。反应条件：PCR 两步法，退火温度为 61℃。采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法对数据进行相对定量，分析肝脏特异性 CD36 敲除小鼠肝脏 CD36 mRNA 表达水平。

1.2.6 Western blot 检测肝脏特异性 CD36 敲除小鼠各组织 CD36 的表达　使用 RIPA 裂解液提取小鼠肝脏、肾脏、附睾脂肪、心肌组织的总蛋白，BCA 试剂盒检测蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样品转至 PVDF 膜。3%牛血清白蛋白 37℃封闭 1.5 小时，一抗 4℃孵育过夜，TBST 洗 3 次每次 15 分钟，二抗室温孵育 1 小时，TBST 洗 3 次每次 15 分钟，ECL 光化学法进行显色，ImageJ 定量。

1.2.7 HE 染色检测肝脏组织结构　小鼠肝脏组织石蜡切片 60℃烤箱 20 分钟，二甲苯Ⅰ浸泡 20 分钟，二甲苯Ⅱ浸泡 20 分钟，无水乙醇浸泡 5 分钟，95%乙醇浸泡 5 分钟，85%乙醇浸泡 5 分钟，70%乙醇浸泡 5 分钟，蒸馏水浸泡 5 分钟，苏木素染色 5 分钟，自来水洗 10 分钟，伊红染色 2 分钟，自来水洗 2 分钟，70%乙醇浸泡 5 分钟，85%乙醇浸泡 5 分钟，95%乙醇浸泡 5 分钟，100%乙醇浸泡 5 分钟，完全干燥后二甲苯浸泡 20 分钟中性树胶封片，显微镜下观察拍照。

1.3 统计学方法

所有数据用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析，数据均以均数±标准差(mean±SD)表示。采用 t-test 对两样本进行比较检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 条件性 CD36 基因敲除打靶载体、ES 细胞的筛选和 Flox 杂合子小鼠的基因型鉴定

将构建的 CD36-cKO 打靶载体质粒经限制性内切酶酶切后鉴定，获得 6500bp 和 8000bp 两个片段，如图 3(a)所示。对抗性 ES 细胞克隆基因组 DNA 抽提后，通过长链 PCR 筛选出正确同源重组的阳性克隆，5'臂同源重组阳性克隆应扩增出 3800bp 片段，阴性克隆应无产物；3'臂同源重组阳性克隆应扩增出 4300bp 片段，阴性克隆应无产物。结果共获得 4 个正确同源重组的阳性 ES 细胞克隆，如图 3(b)所示 E1、E2、E3 和 E4 为阳性克隆，并通过测序确认。通过胚胎移植共获得 3

只高嵌合雄鼠。与 Flp 小鼠交配筛选获得 Flox 杂合子小鼠，基因型鉴定如图 3(c)所示，C1、C2、C3、C4 和 C5 为 Flox 杂合子小鼠，并经测序确认，基因型为 $CD36^{fl/+}$。

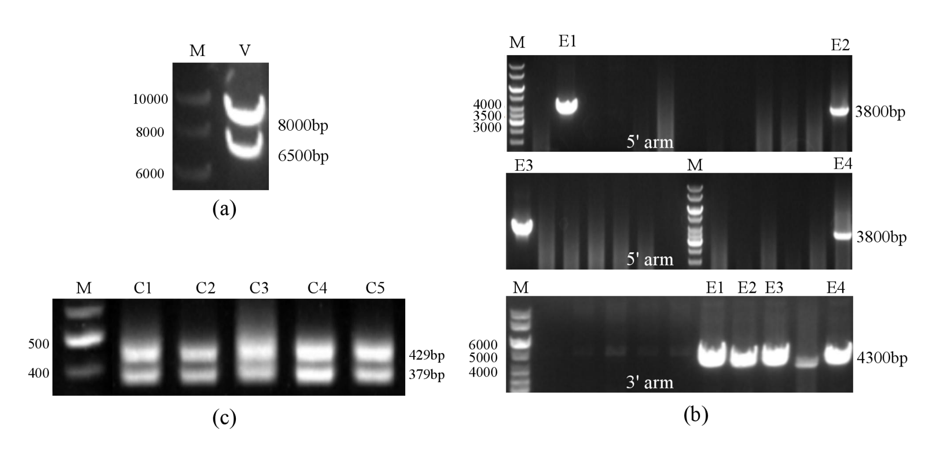


图 3 CD36 条件性基因打靶载体鉴定、ES 细胞筛选和 Flox 杂合子小鼠鉴定结果

Fig. 3 Results of CD36 Conditional Gene Targeting Vector Identification, ES Cell Screening, and Flox Heterozygote Mouse Identification

(a) The CD36 plasmid result of HindIII enzym (b) Results of 5' arm and 3' arm long range PCR

(c) Identification of Flox heterozygous mice M：DNA marker V：CD36-cKO targeting vector

E1,E2,E3,E4：homologous recombination positive ES cells

C1,C2,C3,C4,C5：CD36 heterozygous mouse ($CD36^{fl/+}$)

2.1 肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠的获得与基因型鉴定

F1 代 $CD36^{fl/+}$小鼠与 $Alb\text{-}Cre^{+}$小鼠交配后对 F2 代全部小鼠进行标记和基因型鉴定，1-4 号为 F2 代部分小鼠基因型鉴定结果，5-8 号为 F2 代 $CD36^{fl/+}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$小鼠与 $CD36^{fl/fl}$ 小鼠交配后 F3 代部分小鼠基因型鉴定结果。Flox 鉴定：扩增出 379bp 一条带为野生型基因型是 $CD36^{+/+}$，扩增出 379bp 和 429bp 两条带为杂合子基因型是 $CD36^{fl/+}$，扩增出 429bp 一条带为纯合子基因型是 $CD36^{fl/fl}$。再对 Alb-Cre 进行鉴定：扩增出 450bp 一条带为 $Alb\text{-}Cre^{+}$，没有条带为 $Alb\text{-}Cre^{-}$。所以如图 4 所示，2 号小鼠基因型是 $CD36^{+/+}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$为野生型小鼠，6 号小鼠基因型是 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$为对照小鼠，8 号小鼠基因型是 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$为肝脏特异性 CD36 敲除小鼠。

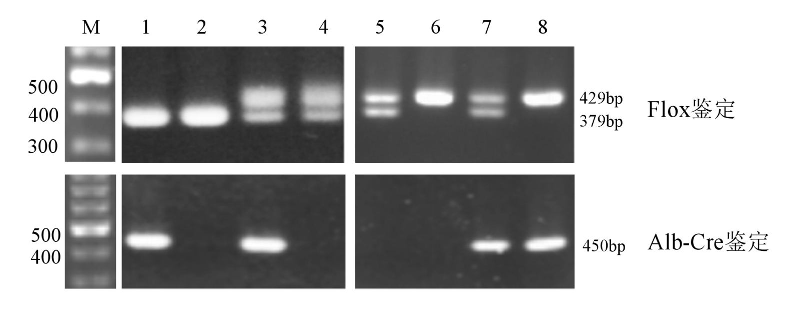


图 4 琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型

Fig. 4 Identification of mouse genotypes by agarose gel electrophoresis

No. 1-4 mice were generated by mating $CD36^{fl/+}$ mice with $Alb\text{-}Cre^{+}$ mice

No. 5-8 mice were generated by mating $CD36^{fl/+}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$ mice with $CD36^{fl/fl}$ mice

1：$CD36^{+/+}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$ 2：$CD36^{+/+}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$

3：$CD36^{fl/+}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$ 4：$CD36^{fl/+}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$

5：$CD36^{fl/+}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$ 6：$CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$

7：$CD36^{fl/+}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$ 8：$CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$

2.2 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠肝脏CD36基因敲除效果验证

2.2.1 肝脏 CD36 敲除效果 DNA 水平验证

通过 PCR 的方法对 Flox 区域进行扩增，定性判断 Cre 是否发挥作用。根据 Flox 区域设计的引物，$CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}基因型应扩增出 1.9Kb 条带；Cre 作用后 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型应扩增出 1.1Kb 条带。结果如图 5 所示，证明 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠 Alb-Cre 重组酶发挥作用敲除了 CD36 基因 Flox 区域。

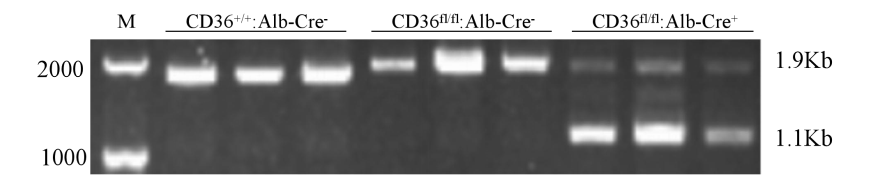


图 5 $CD36^{+/+}$:Alb-Cre^{-}、$CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}和 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}小鼠肝脏标本基因型验证

Fig. 5 Genomic validation of liver specimens of $CD36^{+/+}$:Alb-Cre^{-}, $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-} and $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+} mice

M：DNA marker

2.2.2 肝脏 CD36 敲除效果 mRNA 水平验证

根据实时荧光定量 PCR 结果看出，$CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠即肝脏特异性 CD36 敲除小鼠与对照小鼠 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}基因型小鼠相比，肝脏 CD36 的表达显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，证明肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠构建成功。如图 6。

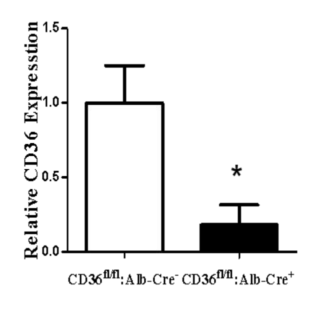


图 6 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}和 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}小鼠肝脏 CD36mRNA 表达情况(n=3)

Fig. 6 Liver CD36 mRNA expression in $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-} and $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+} mice (n=3)

*：$P<0.05$

2.2.3 肝脏 CD36 敲除效果蛋白水平验证

为了进一步验证 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠肝脏 CD36 敲除效果，我们用 Western blot 检测了 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}基因型小鼠和 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠肝脏 CD36 表达水平。结果如图 7 显示，$CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠与 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}对照小鼠相比，肝脏 CD36 表达水平显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。同时检测了其他组织 CD36 的表达情况，可以看出 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{+}基因型小鼠和 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^{-}基因型小鼠在肾脏、脂肪和心肌组织 CD36 表达

无统计学意义(P>0.05)，再次证明了肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠构建成功。

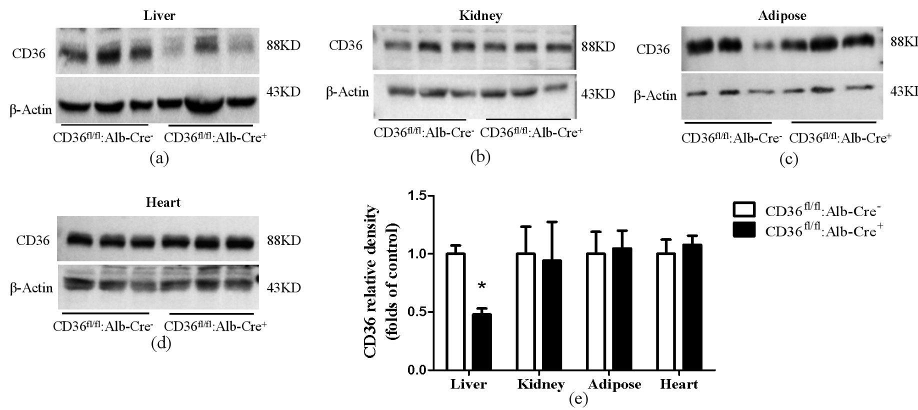


图 7　CD36fl/fl:Alb-Cre-和 CD36fl/fl:Alb-Cre+小鼠肝脏、肾脏、脂肪和心肌组织 CD36 蛋白表达

Figure 7 CD36 protein expression in CD36fl/fl:Alb-Cre- and CD36fl/fl:Alb-Cre+ mice liver, kidney, adipose and myocardial tissue

(a),(b),(c),(d) Expression of CD36 protein in liver, kidney, adipose and myocardial tissue were measured by Western blot

(e)Protein band gray was scanned by Image J software according to Figure 7a,b,c,d

*：P<0.05

2.3 肝脏特异性 CD36 基因敲除对小鼠繁殖、生长和肝脏结构的影响

CD36 基因在肝脏特异性敲除后不影响小鼠的繁殖和生长。6 周 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^-基因型小鼠(n=6)体重为(20.28±0.90)g，同龄 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^+基因型小鼠(n=6)体重为(20.68±0.45)g，两组基因型小鼠体重差异无统计学意义(P>0.05)。HE 染色观察小鼠肝脏形态学改变，图 8 显示两种基因型小鼠肝脏小叶结构完整，肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列，细胞结构完整，未见显著病变，说明肝脏特异性 CD36 基因敲除后不影响肝脏结构和细胞形态。

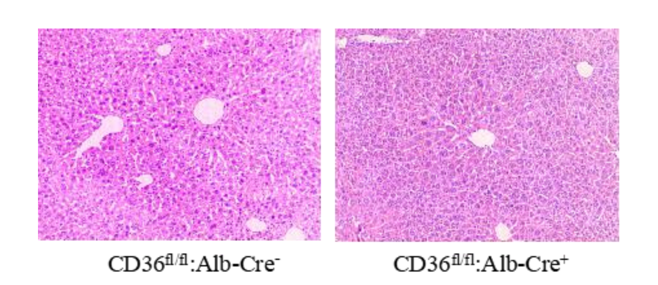


图 8　$CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^-和 $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^+ 基因型小鼠肝脏 HE 染色(10*20)

Fig. 8 Hepatic HE staining of $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^- and $CD36^{fl/fl}$:Alb-Cre^+ mice　(10*20)

3 讨论

脂肪酸转运蛋白 CD36 参与脂肪酸跨膜转运，对细胞内外脂质分布及代谢发挥重要作用。CD36 可以介导多种细胞类型中脂肪酸的摄取，但在正常肝细胞中以非常低的水平表达，而在饮食诱导的肥胖症的动物模型的肝细胞中表达增加，这与升高的脂肪酸摄取相关[12]。有研究显示，分布于肝脏的 CD36 与 NAFLD 的

发生、发展关系密切[13,14]。CD36 向肝细胞质膜转运脂肪酸可能导致 NAFLD 患者肝脏脂肪堆积[15]。并且癌细胞也经常表现出脂肪酸代谢的变化，用以满足能量需求，维持癌细胞的生长和增殖[16]，有研究发现 CD36 能帮助肿瘤细胞从周围环境中摄取脂肪酸，作为肿瘤细胞转移的能量来源[17]。近些年研究发现，CD36 还可以通过组装 Toll 样受体 4 和 6 异二聚体来促进无菌性炎症[18]。有文献报导 CD36 通过促进肝脏炎症和介导趋化因子 CXCL10 的促凋亡作用在伴刀豆球蛋白 A 诱导的肝损伤中起重要促炎作用，因此可能是免疫介导的肝炎的潜在治疗靶点[19]。但是 CD36 在肝脏疾病中的作用和机制还有待进一步研究。

构建基因敲除小鼠，使某种基因在体内或某种组织缺乏，是研究该基因功能的主要方法之一。Cre/Loxp 重组酶系统的基因敲除技术，是基于 Cre 重组酶可以识别 Loxp 序列的特异回文结构并催化两个 Loxp 序列之间的基因片段发生重组，从而将目的基因的 Loxp 区域敲除。如果 Cre 重组酶通过基因工程技术置于组织或细胞特异性启动子之后，即可实现对某种组织或细胞特定的基因进行敲除[20,21]。

本研究为构建肝脏特异性 CD36 敲除小鼠，首先构建了 Flox 杂合子小鼠。该小鼠是在 CD36 基因的 5 号外显子两端各插入了一个 Loxp 位点，与肝脏特异性表达 Cre 重组酶的 Alb-Cre 小鼠交配后，子代中 Flox 纯合 Alb-Cre 阳性 ($CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$)的小鼠 Alb-Cre 重组酶特异性识别肝脏 CD36 基因 Loxp 位点，肝脏 CD36 基因的 Flox 区域被敲除，从而获得肝脏特异性 CD36 基因敲除的小鼠。获得肝脏特异性 CD36 敲除小鼠后，我们从 DNA、mRNA 和蛋白水平对肝脏 CD36 的敲除效果进行了验证，均证明肝脏 CD36 基因被成功敲除，同时检测了其他组织 CD36 的表达，证明 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{+}$基因型小鼠和 $CD36^{fl/fl}$:$Alb\text{-}Cre^{-}$基因型小鼠在肾脏、脂肪和心肌组织 CD36 表达差异无统计学意义。实验中发现肝脏特异性敲除 CD36 基因不影响小鼠的生长和繁殖，并且 HE 染色观察 CD36 基因敲除不影响肝脏结构。基于 Cre/Loxp 重组酶系统，本课题组成功构建了肝脏特异性 CD36 基因敲除小鼠，为进一步研究肝脏 CD36 的功能提供了动物模型。

参考文献

[1] Gotoda T,Iizuka Y,Yamada N.Complex connection between CD36 and atherosclerosis,lipid metabolism,andinsulin resistance syndromes.Curr Atheroscler Rep,2000,2(6):453-454.

[2] Pepino MY, Kuda O, Samovski D,et al.Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism.Annu Rev Nutr, 2014;34(1):281-303.

[3] Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. Nat Rev Immunol,2013, 13(9):621-634.

[4] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL.CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism.J Clin Invest, 2001,108(6):785-791.

[5] Wilson CG, Tran JL, Erion DM, et al. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD fed mice. Endocrinology,2016,157(2):570-585.

[6] Pan X, Wang P, Luo J, et al. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. Endocrine,2015,48(3):834-847.

[7] Nath A, Li I, Roberts LR,et al.Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma.Sci Rep,2015,5:14752.

[8] Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombinerring-based method for generating conditional knockout mutations. Genome Res,2003,13(3):476-484.

[9] Chan W, Costantino N, Li R,et al. A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction. Nucleic Acids Res. 2007,35(8):e64.

[10] 孙一平,王越,金镇,等.SHBG 基因敲除小鼠模型的建立及其表型分析.中国生物工程杂志.2017,37(8):39-45.
Sun YP,Wang Y,Jin Z,et al.Establishment and phenotypic analysis of SHBG knockout mouse model.China Biotechnology,2017,37(8):39-45.

[11] 陈静静,邢桂春,张令强.基于 Loxp/Cre 系统的 FBXL15 基因敲除小鼠模型的建立.中国生物工程杂志.2015,35(4):74-79.
Chen JJ,Xing GC,Zhang LQ.Establishment of FBXL15 knockout mouse model based on Loxp/Cre system.China Biotechnology,2015,35(4):74-79.

[12] Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M,et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. Diabetes,2007,56(12):2863-2871.

[13] Luiken JJ, Arumugam Y, Dyck DJ, et al. Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. J Biol Chem,2001,276(44):40567-40573.

[14] Heebøll S, Poulsen MK, Ornstrup MJ, et al.Circulating sCD36 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease and controls.Int J Obes (Lond),2017,41(2):262-267.

[15] Miquilena-Colina ME,Lima-Cabello E,Sánchez-Campos S,et al.Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C.Gut,2011,60(10):1394-1402.

[16] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer.Cell Metabolism,2013,18(2):153-161.

[17] Pascual G,Avgustinova A,Mejetta S,et al.Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36.Nature,2017,541(7635):41-45.

[18] Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll - like receptor 4 and 6 heterodimer. Nat Immunol, 2010,11(2):155 - 161.

[19] Gao H,Volat F,Sandhow L,et al.CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential.Stem Cells,2017,35(7),1799-1814.

[20] Schmidt-Supprian M 1, Rajewsky K.Vagaries of conditional gene targeting.Nat Immunol,2007,8(7):665-668.

[21] Baker LG, Lodge JK.Multiple gene deletion in Cryptococcus neoformans using the Cre-lox system.Methods Mol Biol,2012,845:85-98.